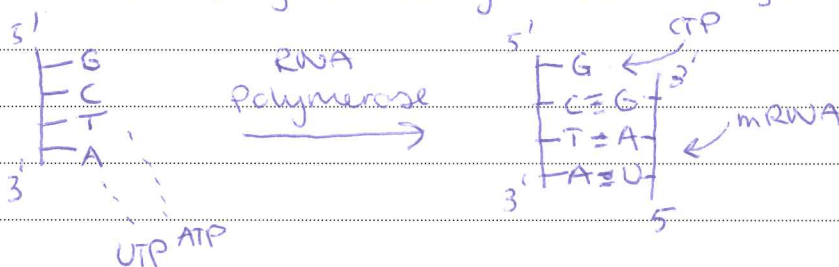




Oppgave 1

TRANSKRIPSJON HOS PROKARYOTER

For å kunne produsere et protein fra et gen må koden fra genot i DNA transkriberes til mRNA før den videre går til ribosomene for translasjon. Det dannes RNA fra DNA vha. Polymerase og ribonukleinsyrene ATP, UTP, GTP og CTP.



Det legges alltid til nukleotider i 3'enden (5' → 3'). Det er den tråden som ikke brukes til kopieringen som kalles for "coding strand" eller som det produserte mRNA'et vil ha den samme koden som den tråden, med unntak i at det er basen Uracil i RNA i stedet for Thymin som i DNA. Transkripsjonen skjer i 3 steg:

Initiering → Elongering → terminering

Initiering:

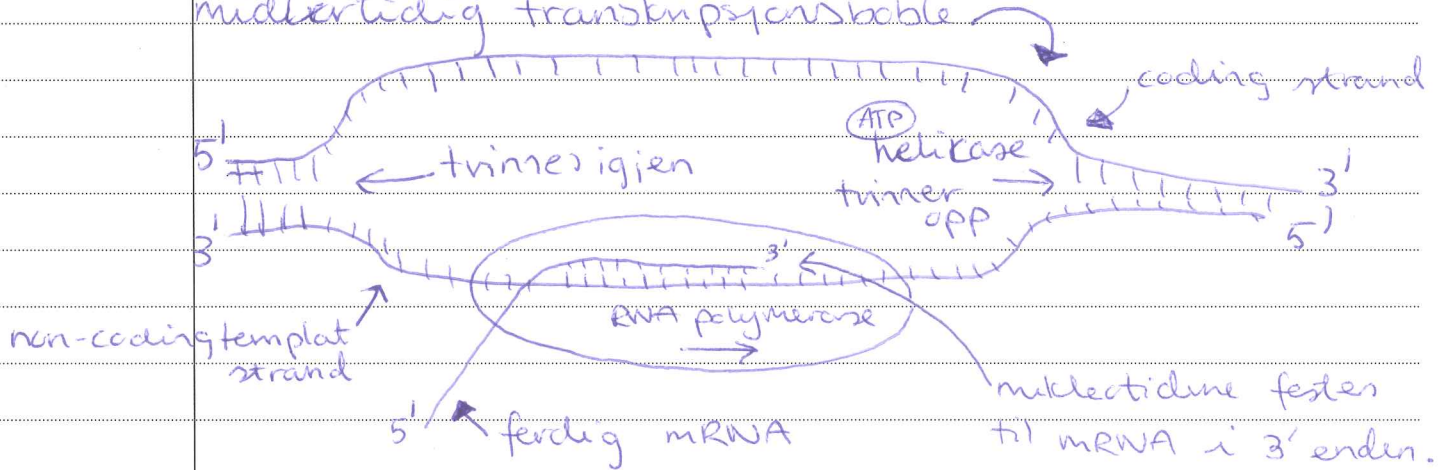
For å kunne starte transkripsjonen må Polymerasen gjenkjenne og feste seg til et punkt på ~~DNA~~ den ene DNA tråden. Dette klarer den ikke alene og må ha hjelp av en  $\sigma$  faktor (sigma). Polymerasen fester seg slik at transkripsjonen av mRNA går i en 5' → 3' retning. I motsetning til ~~for~~ hos eukaryote trenger ikke RNA polymerase en primer for å begynne prosessen, den kan starte å kopiere ved å kun ha tilgang til basene og et DNA-templat. Når polymerasen har festet seg og det er klart for elongering, dette er  $\sigma$  av. Helicase tiner opp trådene i DNA'heliksen

OBS! Se ark nr. 6





1 fort. midlertidig slik at polymerasen slipper til. Dobbeltråddene festes sammen igjen etter at polymerasen har beveget seg fremover. Det dannes altså en midlertidig transkripsjonsboble



Elongering:

templatet

mRNA'et forlenges ved at polymerasen beveger seg bortover DNA'et og nye nukleotider legges til ut fra hvilke baser som befinner seg i den kodende DNA' delen. Basene er komplementære og G-parer seg med Cytosin og Adenin parer seg med Uracil (Thymis i DNA). Helikase trinner opp det dobbelttrådede DNA'et slik at polymerasen kan bruke den ene tråden (den ikke kodende templat-tråden) som templat.

Terminering:

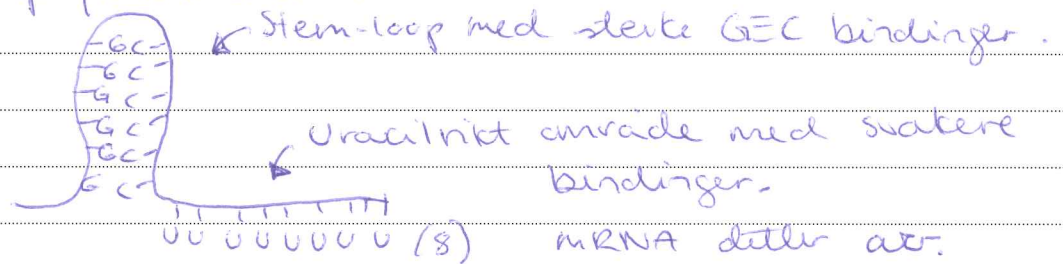
Transkripsjonen av mRNA avsluttes på en av to måter. Den ene er at det dannes en 'stem loop' på den ~~avsluttede~~ delen av mRNA som er ferdig transkribert. Dette skjer fordi det er et G=C rikt område og ved at RNA'et bøyler seg og danner







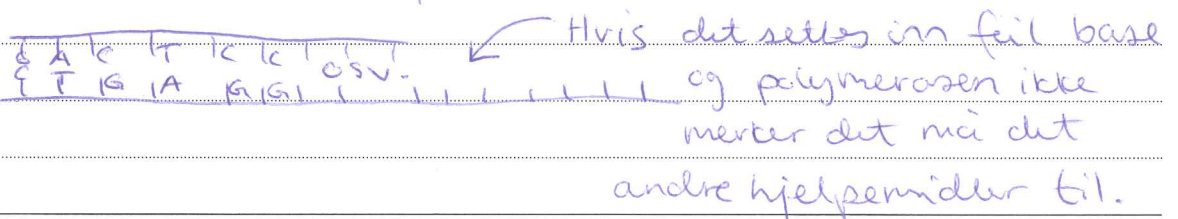
1 fort: bindinger med seg selv innad i enkelttråden. Dette gir en stabil struktur. Det G=C rike området (G=C ~~bin~~ binds sammen av en tippelbinding: sterkere) etterfølges av et U rikt område (svakere bindinger) og dette fører til at mRNA løsnes fra DNA og transkripsjonen ender.



En annen måte for terminering er at det kommer inn en Rho-faktor. Denne trirer opp mRNA fra DNA. Når polymerasen når et G=C rikt område går prosessen saktere og Rho-faktoren tar igjen polymerasen og trirer opp komplekset. I motsetning til hos eukaryoter trenger ikke mRNA'et modifisering ettersom at transkripsjonen skjer samtidig og på samme plass.

## Oppgave 2 Mismatch repair

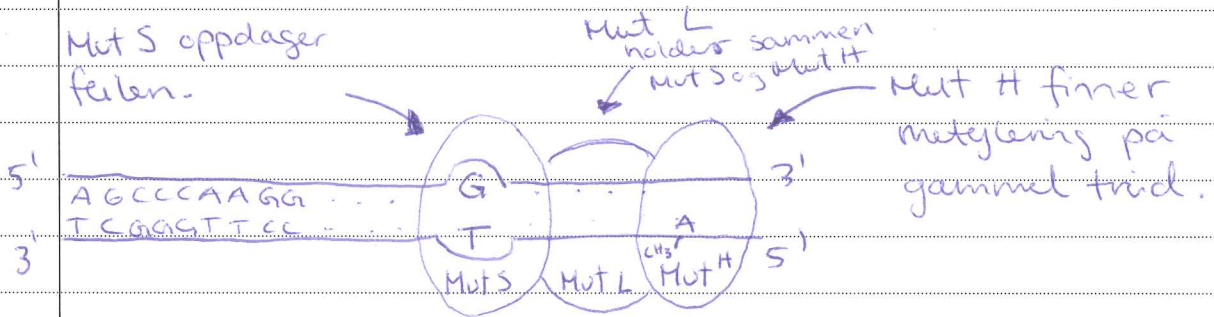
Det er veldig viktig at DNA replikasjonen skjer på riktig måte for å unngå farlige mutasjoner. Det finnes flere måter å reparere DNA hvis feil nukleotid er satt inn og en av disse er mismatch repair. Hvis de har unngått proofreading. I replikasjonen kopieres DNA og vha. et templat settes det inn komplementære baser.





Oppg. 2 forts.

Hvis et galt nukleotid er satt inn kommer det 3 faktorer til unnsetning: Mut S, Mut H og Mut L.



Mut S fester seg til området hvor det har oppstått en gal baseparing. Når den gale basen skal fjernes er det viktig at det er basen fra den nye tråden fjernes og ikke den gamle (mutasjon vil da forekomme). Dette ordnes ved at Mut H leder etter en metylering på en Adenosin på den gamle tråden. Det har ikke rukket å feste seg en metyl-gruppe på den nye tråden enda. Mut L sørger for å koble sammen Mut S og Mut H. Den gale nukleotiden kuttes ut og polymerase setter inn ny og ligase tiner det sammen.

et GTAC område

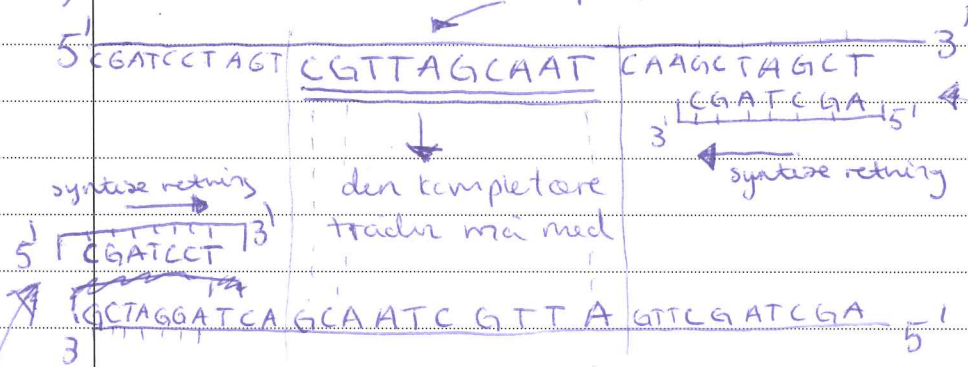
et større stykke





Oppgave 3.

a) Området som skal amplifiseres:



Vi må ha to primere for å amplifisere det ønskede området, en fra hver side. Sekvensen må altså kjennes til på forhånd.

Primer til den øverste tråden: 3' CGATCGA 5'

Primer til den nedste tråden: CGATCCT 3'

Addering av nukleotider må alltid skje i 5' → 3' retning.

PCR kjøres og man sitter igjen med større mengder av det ønskede DNA-fragmentet som nå kan undersøkes videre.



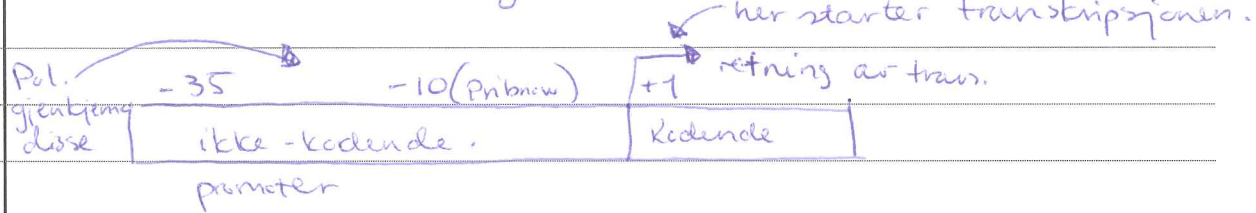
Emnekode : ML-208  
 Kandidatnr. : 4618  
 Dato : 26/11/15  
 Ark nr. : 6 av 9

Til Spm 1

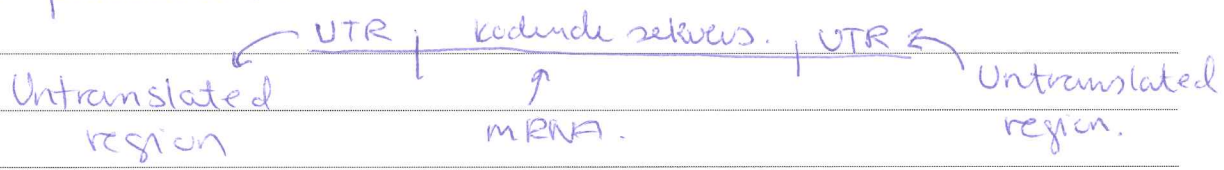
Fort. fra side 1

Del av Initiering transkripsjon:

Polymerasen fester seg til bestemte steder på DNA. Den kjerner igjen bestemte sekvenser oppstrøms for der transkripsjonen starter. Disse sekvensene er nesten like hos alle og befinner seg på nukleotid -35 fra transkripsjonstart og -10 (Pribnow). Første nukleotid som blir lagt til er +1 osv.



Disse sekvensene eller boksene (-35 og -10) blir altså ikke transkribert, men er en essensiell del av prosessen. Det kan også nevnes at mRNA'et som dannes også består av ~~en~~ områder som ikke skal translateres men som spiller en viktig rolle i prosessene.







Emnekode : ML-208  
 Kandidatnr. : 4618  
 Dato : 26/11/15  
 Ark nr. : 7 av 9

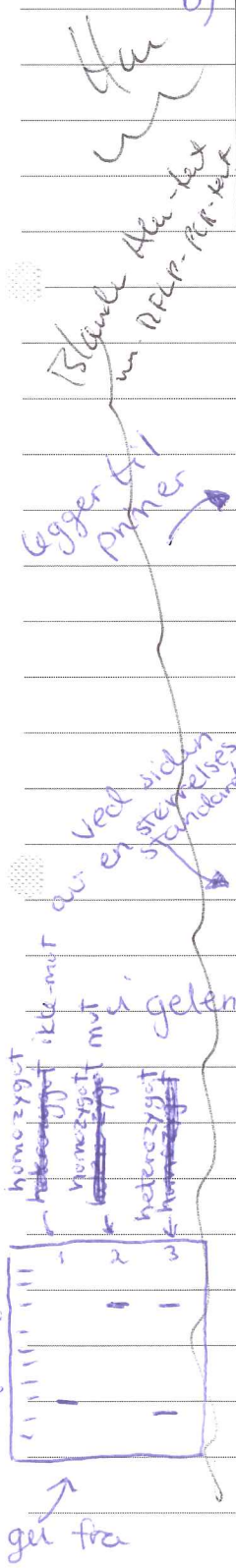
Oppgave 3

b)

Et Alu-element er en sekvens som er repetert flere ganger etter hverandre. Det er en SINE-sekvens (short interspersed element), som består av korte sekvenser etter hverandre. Alu-elementet er dimorf, dvs at noen har mutasjonen på kromosom 1 og noen har den ikke. Prosedyre for å sjekke om man har Alu-elementet:

Man isolerer DNA fra seg selv. F. eks ved å skylle munnen med fysiologisk saltvann. Man gjør så disse prøvene klare for PCR (sentrifugering), putter de i PCR-rør og kjører PCR for å amplifisere DNA'et. PCR dimanterer DNA ved høy temperatur for å så heve temperaturen igjen slik at primerene kan feste seg og starte replikasjon eksponentiell vekst.

Etter PCR tilsettes det restriksjonsenzym og farge til prøvene og de plasseres i en elektroforesemaskin. Her tilføres prøvene i brønner i en gel. Strøm tilføres og DNA fragmentene som er negativt ladet vil vandre mot en positivt ladet pol. Små korte fragmenter vil vandre lengre enn store fragmenter. Gelen blir fotografert med UV-lys for å se på båndene. Hvis restriksjonsenzymet var tilstede vil fragmentet bli kuttet og man får ett bånd som vandret langt (homozygot for ikke-mutasjon). Hvis gelen har ett bånd som ikke har vandret langt vil det si at man har mutasjonen og restriksjonsenzymet er borte på begge kromosomene (homozygot for mutasjonen). Hvis man har to bånd i gelen, ett langt og ett kort, vil det si at man har mutasjonen på det ene kromosomet (heterozygot for mutasjonen).





Emnekode : ML-208  
Kandidatnr. : 4618  
Dato : 26/11/15  
Ark nr. : 8 av 9

Oppgave 4 se ark vedlegg.

Fragment 1 har ca 380bp  
Fragment 2 har ca 270bp  
Fragment 3 har ca 160bp.

Oppgave 5. cDNA: complementary DNA. DNA dannet fra mRNA ved hjelp av en reaksjon som heter revers transkriptase. Går altså motsatt vei, danner DNA fra RNA. Dette brukes ofte til å klonere eukaryotisk gen i en prokaryot.

cDNA bibliotek: en samling av alle mRNA fra en organisme overført til cDNA. Inneholder alle mulige sekvenser/gener som koder for proteiner.

Modellorganisme: Organisme som brukes i genteknologi. Har kort generasjonstid og er enkle å holde i fangenskap og å arbeide med. Kan sekvensere hele genomet. Eks: bananflue, gjæringsopp og MUS.

Hvis man har et cDNA bibliotek som inneholder alle mulige <sup>(mRNA)</sup> gener som koder for alle proteiner kan man ved hjelp av dette ~~isolasjon~~ ~~gjenne~~ ~~isolasjon~~ ~~gjenne~~ ~~isolasjon~~ ~~gjenne~~ finne ut hva det ukjente proteinet som er isolert er. I cDNA-biblioteket ligger mRNA'et som dannet proteinet og ~~isolasjon~~ ~~gjenne~~ ~~isolasjon~~ ~~gjenne~~ vi kan derfor finne ut hvilket protein mRNA'et koder for. Vi vet hvilke koderer (3 basepar) <sup>som</sup> danner hvilke







Emnekode : ML-208  
Kandidatnr. : 4618  
Dato : 26/11/15  
Ark nr. : 9. av 9

Oppgave 5.  
forts.

amino-syrer. Ved å finne den genetiske koden  
~~MR~~ ~~proteiner~~ i mRNA'et kan vi finne ut  
hvilket protein vi har isolert. Hvis vi vil kan vi  
føre inn dette proteinet i en prokaryot via en  
vektor (f.eks plasmid) og clone proteinet ved å dyrke  
opp bakteriene. Ved å ha et cDNA bibliotek for  
en organisme har man altså en "fosit" hvor man  
vet hvilke gener som koder for hvilke proteiner.



(Til bruk i oppgave 4)

Emnekode: ML-208  
Kandidatnr: 4618

